

⑧ BUNDESREPUBLIK  
DEUTSCHLAND



DEUTSCHES  
PATENT- UND  
MARKENAMT

⑧ Offenlegungsschrift  
⑧ DE 199 56 568 A 1

⑧ Int. Cl. 7:  
C 12 N 15/63

C 12 N 15/65  
A 61 K 48/00  
C 12 N 15/67  
A 61 K 31/13

(37)

DE 199 56 568 A 1

⑧ Aktenzeichen: 199 56 568 6  
⑧ Anmeldetag: 24. 11. 1999  
⑧ Offenlegungstag: 17. 8. 2000

⑧ Innere Priorität:  
199 03 713. 2 30. 01. 1999

⑧ Erfinder:  
Kreutzer, Roland, Dr., 95466 Weidenberg, DE;  
Limmer, Stephan, Dr., 95447 Bayreuth, DE

⑧ Anmelder:  
Kreutzer, Roland, Dr., 95466 Weidenberg, DE;  
Limmer, Stephan, Dr., 95447 Bayreuth, DE

⑧ Vertreter:  
Geßner, W., Dr.-Ing., Pat.-Anw., 91052 Erlangen

Die folgenden Angaben sind den vom Anmelder eingesetzten Unterlagen entnommen

⑧ Verfahren und Medikament zur Hemmung der Expression eines vorgegebenen Gens

⑧ Die Erfindung betrifft ein Medikament mit mindestens einem Oligoribonukleotid (dsRNA) mit doppelsträngiger Struktur zur Hemmung der Expression eines Zielgens, wobei ein Strang der dsRNA zumindest abschnittsweise komplementär zum Zielgen ist.

DE 199 56 568 A 1

I  
Beschreibung

Die Erfindung betrifft ein Verfahren nach dem Oberbegriff des Anspruchs 1. Sie betrifft ferner ein Medikament und eine Verwendung doppelsträngiger Oligoribonukleotide.

Ein solches Verfahren ist aus der nachveröffentlichten WO 99/32619 bekannt. Das bekannte Verfahren zielt auf die Hemmung der Expression von Genen in Zellen von Invertebraten ab. Dazu ist es erforderlich, dass das doppelsträngige Oligoribonukleotid eine zum Zielgen identische Sequenz mit einer Länge von mindestens 50 Basen aufweist. Zur Erzielung einer effizienten Hemmung ist eine Länge der identischen Sequenz von 300 bis 1000 Basenpaaren erforderlich. Der Herstellungsaufwand eines solchen Oligoribonukleotids ist hoch.

Die DE 196 319 C2 beschreibt eine Anti-Sinn-RNA mit besonderen Sekundärstrukturen, wobei die Anti-Sinn-RNA in Form eines kodierenden Vektors vorliegt. Bei der Anti-Sinn-RNA handelt es sich um eine RNA-Molekül das komplementär zu Bereichen der mRNA ist. Durch Bindung an diese Bereiche wird eine Hemmung der Genexpression bewirkt. Diese Hemmung kann insbesondere zur Diagnose und/oder Therapie von Erkrankungen, z. B. Tumorerkrankungen oder viralen Infektionen, eingesetzt werden. – Die Anti-Sinn-RNA muß nachweislich in einer Menge in die Zelle eingebracht werden, die mindestens genauso groß wie die Menge der mRNA ist. Die Wirksamkeit der bekannten Anti-Sinn-Verfahren ist nicht besonders hoch.

Aus der US 5,712,257 ist ein Medikament bekannt, das fühlgepaarte doppelsträngige RNA (dsRNA) und biologisch aktive fühlgepaarte Bruchstücke von dsRNA in Form eines ternären Komplexes mit einem überflächennahen Mützen enthält. Die dabei verwendete dsRNA besteht aus synthetisch hergestellten Nukleinsäurezweisträngen ohne definierte Basensequenz. Die Einzelzweistränge gehörn nicht-reguläre, sog. „Nicht-Watson-Crick“-Basenpaarungen miteinander ein, so daß fühlgepaarte Doppelstränge gebildet werden. Die bekannte dsRNA dient zur Hemmung der Vermehrung von Retroviren, wie HIV. Die Vermehrung des Virus kann gehemmt werden, wenn nickspezifische dsRNA in die Zellen eingebracht wird. Es kommt dabei zu einer Induktion von Interferon, wodurch die Virusvermehrung gehemmt werden soll. Der hemmende Effekt bzw. die Wirklichkeit dieses Verfahrens ist gering.

Aus Finn, A. et al., NATURE, Vol. 391, pp. 806, ist es bekannt, daß dsRNA, deren einer Strang abschnittsweise komplementär zu einem zu hemmenden Gen einer Fadenwurms ist, die Expression dieses Gens mit einer hohen Wirkamkeit hemmt. Es wird die Aufassung vertreten, daß die besondere Wirkamkeit der verwendeten dsRNA in Zellen des Fadenwurms nicht auf dem Anti-Sinn-Prinzip beruht, sondern möglicherweise auf katalytischen Eigenschaften der dsRNA bzw. durch sie induzierte Enzyme zurückzuführen ist. – Über die Wirkamkeit spezifischer dsRNA in bezug auf die Hemmung der Genexpression, insbesondere in Säugergeweben und humanen Zellen, ist in diesem Artikel nichts ausgesagt.

Aufgabe der vorliegenden Erfindung ist es, die Nachteile nach dem Stand der Technik zu beheben. Es soll insbesondere ein möglichst effizientes Verfahren, Medikamenten bzw. eine möglichst effiziente Verwendung zur Herstellung eines Medikaments angegeben werden, mit dem der eine besondere wirksame Hemmung der Expression eines vorgegebenen Gens bewirkbar ist.

Diese Aufgabe wird durch die Merkmale der Ansprüche 1, 2, 33, 34 und 66 und 67 gelöst. Vorteilhafte Ausgestaltungen ergeben sich aus den Ansprüchen 3 bis 32, 35 bis 65 und 68 bis 100.

Nach Maßgabe der verfahrensseitigen Erfindung ist vorgesehen, daß der zum Zielgen komplementäre Bereich höchstens 49 aufeinanderfolgenden Nukleotidpaare aufweist.

5 Bei den erfundsgemäßen Oligoribonukleotiden handelt es sich um solche, die zumindest abschnittsweise eine definierte Nukleotidsequenz aufweisen. Der definitive Abschnitt kann auf den komplementären Bereich beschränkt sein. Es kann aber auch sein, daß das doppelsträngige Oligoribonukleotid insgesamt eine definierte Nukleotidsequenz aufweist.

Es hat sich überraschenderweise gezeigt, daß bereits bei einer Länge des komplementären Bereichs von höchstens 49 Basenpaaren eine wirksame Hemmung der Expression des Zielgens erreicht werden kann. Entsprechende Oligoribonukleotide können mit geringerem Herstellungsaufwand hergestellt werden.

In besonderen dsRNAs mit einer Länge von mehr als 50 Nukleotidpaaren induziert in Säugergeweben und humanen Zellen bestimmte zelluläre Mechanismen, z. B. die dsRNA-abhängige Protein kinase oder das 2'-5'A-System. Das führt zum Verschwinden des durch die definierte Sequenz aufweisende dsRNA vermittelten Interferenzeffektes. Dadurch wird die Proteinbiosynthese in der Zelle blockiert. Insbesondere dieser Nachteil wird durch die vorliegende Erfindung beseitigt.

Weiterhin ist die Aufnahme von dsRNA mit kurzer Kettenlänge in die Zelle bzw. in den Zellkern gegenüber längerkettenigen dsRNAs deutlich erleichtert.

Seien dsRNA als Werkstoff benutzt wird, hat es sich als vontheilhaft erwiesen, daß die dsRNA verpackt in mikroelare Strukturen, vorzugsweise in Liposomen, vorliegt. Die dsRNA kann gleichfalls in virale natürliche Kapside oder in auf chemischem oder enzymatischem Weg hergestellte

33 künstliche Kapsid oder davon abgeleitete Strukturen eingeschlossen sein. – Die vorgenannten Merkmale ermöglichen einen Einstromen der dsRNA in vorgegebene Zielzellen.

Nach einem weiteren Ausgestaltungsmerkmal weist die dsRNA 10 bis 1000, vorzugsweise 15 bis 49, Basenpaare auf. Die dsRNA kann also länger als der zum Zielgen komplementäre Bereich sein. Der komplementäre Bereich kann endständig angeordnet oder in der dsRNA eingeschaltet sein. Eine solche dsRNA bzw. ein zur Kodierung derselben vorgelegter Vektor können synthetisch bzw. enzymatisch

45 mit gängigen Verfahren hergestellt werden.

Das zu hemmende Gen wird zweckmäßigweise in eukaryotischen Zellen exprimiert. Das Zielgen kann aus der folgenden Gruppe ausgewählt sein: Onkogen, Cytokin-Gen, Id-Protein-Gen, Entwicklungs-Gen, Prionen. Es kann auch in pathogenen Organismen, vorzugsweise in Plasmodien, exprimiert werden. Es kann Bestandteil eines, vorzugsweise humanpathogenen, Virus oder Viroids sein. – Das vorgeschlagene Medikament erlaubt die Therapie genetisch gesteuerter Krankheiten, z. B. Krebs, viraler Erkrankungen oder Morbus Alzheimer.

Das Virus oder Viroid kann auch ein tier- oder pflanzenpathogenes Virus oder Viroid sein. In diesem Fall erhält das erfundsgemäße Medikament auch die Behandlung von Tier- oder Pflanzenkrankheiten.

Nach einem weiteren Ausgestaltungsmerkmal ist die dsRNA abschnittsweise doppelsträngig ausgebildet. Der komplementäre Bereich aus zwei separaten RNA-Einzelsträngen oder aus selbstkomplementären Bereichen eines, vorzugsweise zirkulär ausgebildeten, topologisch geschlossenen RNA-Einzelstrangs gebildet wird.

Die Enden der dsRNA können modifiziert werden, um einen Abbau in der Zelle oder einer Dissoziation in die Einzelstränge entgegenzuwirken. Eine Dissoziation tritt imbe-

sondere bei Verwendung niedriger Konzentrationen oder kurzer Kettenlängen auf. Zur besonders wirksamen Hemmung der Dissoziation kann der durch die Nukleotidpaare bewirkte Zusammenhalt des komplementären Bereichs durch mindestens eine, vorzugsweise zwei, weitere chemische Verknüpfungen erhöht werden. – Eine erfindungsgemäße dsRNA, deren Dissoziation vermindert ist, weist eine höhere Stabilität gegen enzymatischen und chemischen Abbau in der Zelle bzw. im Organismus auf.

Insbesondere bei Verwendung eines erfindungsgemäßen Vektors kann der komplementäre Bereich aus selbstkomplementären Bereichen einer RNA-Haarnadelstruktur gebildet werden. Die Nukleotidpaare im Schleifenbereich zwischen der doppelsträngigen Struktur zum Schutz vor Abbau zweckmäßig Bigerisch modifiziert.

Die chemische Verknüpfung wird zweckmäßigerverweise durch eine kovalente oder ionische Bindung, eine Wasserstoffbrückebindung, hydrophobe Wechselwirkungen, vorzugsweise van-der-Waals- oder Stapelungswirkungen, oder durch Metall-Ionenkoordination gebildet. Sie kann nach einem besonders vorzuhaltenden Ausgestaltungskriterium an mindestens einem, vorzugsweise an beiden, Enden des komplementären Bereichs hergestellt werden.

Es hat sich weiter als vorteilhaft erwiesen, daß die chemische Verknüpfung mittels einer oder mehrerer Verbindungsgruppen gebildet wird, wobei die Verbindungsgruppen vorzugsweise Poly-(oxypyrophosphoryloxy-1,3-propandiyl)- und/oder Polyethylenglycol-Ketten sind. Die chemische Verknüpfung kann auch durch in den komplementären Bereichen anstelle von Purinen benutzte Purinanaloga gebildet werden. Von Vorteil ist es ferner, daß die chemische Verknüpfung durch in den komplementären Bereichen eingeführte Azaarzenzoleinheiten gebildet wird. Sie kann außerdem durch in den komplementären Bereichen anstelle von Nukleotiden benutzte vorzuhaltende Nukleotidanaloga gebildet werden.

Es hat sich als zweckmäßig erwiesen, daß zur Herstellung der chemischen Verknüpfung mindestens eine der folgenden Gruppen benutzt wird: Methylenblau; bifunktionale Gruppen, vorzugsweise Bis-(2-chlorophenyl)-amin-N-acetyl-N-(*p*-glyoxylobenzoyl)-cystamin; 4-Thiouracil; Paornatri. Ferner kann die chemische Verknüpfung durch an den Enden des doppelsträngigen Bereichs eingesetzte Thiolophosphoryl-Gruppen gebildet werden. Vorzugsweise wird die chemische Verknüpfung an den Enden des doppelsträngigen Bereichs durch Triphellex-Bindungen hergestellt.

Die chemische Verknüpfung kann zweckmäßigerverweise durch ultraviolettes Licht induziert werden.

Nach einer weiteren besonders vorzuhaltenden Ausgestaltung ist vorgesehen, daß die dsRNA an mindestens ein von einem Virus stammenden, davon abgeleiteten oder ein synthetisch hergestelltes virales Hüllprotein gebunden, damit assoziiert oder davon umgeben wird. Das Hüllprotein kann vom Poliomavirus abgleichen sein. Es kann das Hüllprotein das Virus-Protein 1 (VP1) und/oder das Virus-Protein 2 (VP2) des Poliovirus enthalten. – Die vorgenannten Merkmale erleichtern wesentlich das Einführen der dsRNA in die Zelle.

Vorzugsweise ist bei Bildung eines Kapsids oder kapsidartigen Gebildes aus dem Hüllprotein die eine Seite zum Inneren des Kapsids oder kapsidartigen Gebildes gewandt. Das gebildete Konsort ist besonders stabil.

Die dsRNA kann zum prämieren oder prozessierenden RNA-Transkript des Zielsegments komplementär sein. – Die Zelle kann eine Vertebratezelle oder eine menschliche Zelle sein.

Nach Maßgabe der Erfindung ist ferner ein Medikament mit mindestens einem Oligoribonukleotid (dsRNA) mit doppelsträngiger Struktur zur Hemmung der Expression ei-

nes vorgegebenen Gens vorgesehen, wobei ein Strang der dsRNA zumindest abschnittsweise komplementär zu diesem Gen ist. – Es hat sich überraschend gezeigt, daß eine solche dsRNA sich als Medikament zur Hemmung der Expression eines vorgegebenen Gens in menschen Zellen eignet. Die Hemmung wird im Vergleich zur Verwendung einzelsträngiger Oligoribonukleotide bereits bei Konzentrationen bewirkt, die um mindestens eine Größenordnung niedriger sind. Die erfindungsgemäße Medikament ist hoch wirksam. Es sind geringere Nebenwirkungen zu erwarten.

Nach weiterer Maßgabe der Erfindung ist ein Medikament mit mindestens einem Vektor zur Kodierung doppelsträngiger Oligoribonukleotide (dsRNA) zur Hemmung der Expression eines vorgegebenen Gens vorgesehen, wobei ein Strang der dsRNA zumindest abschnittsweise komplementär zu diesem Gen ist. – Das vorgeschlagene Medikament weist die vorgenannten Vorteile auf. Durch die Verwendung eines Vektors können insbesondere Herstellungskosten eingespart werden.

Noch einer besonders vorteilhaften Ausgestaltung weist der komplementäre Bereich höchstens 49 aufeinanderfolgende Nukleotidpaare auf. – Es hat sich überraschenderweise gezeigt, daß bereits bei einer Länge des komplementären Bereichs von höchstens 49 Basenpaaren eine effiziente Hemmung der Expression des Zielsegments erreicht werden kann. Entsprechende Oligoribonukleotide können mit geringem Herstellungsaufwand bereitgestellt werden.

Nach weiterer Maßgabe der Erfindung ist eine Verwendung doppelsträngiger Oligoribonukleotide zur Herstellung eines Medikaments zur Hemmung der Expression eines vorgegebenen Gens vorgesehen, wobei ein Strang der dsRNA zumindest abschnittsweise komplementär zu diesem Gen ist. – Überauschneidenderweise eignet sich eine solche dsRNA zur Herstellung eines Medikaments zur Hemmung der Expression eines vorgegebenen Gens. Bei einer Verwendung von dsRNA wird die Hemmung im Vergleich zur Verwendung einer einzelsträngigen Oligoribonukleotide schon bei um eine Größenordnung geringeren Konzentrationen bewirkt. Die erfindungsgemäße Verwendung ermöglicht also die Herstellung besonders wirksame Medikamente.

Nach weiterer Maßgabe der Erfindung ist die Verwendung eines Vektors zur Kodierung doppelsträngiger Oligoribonukleotide (dsRNA) zur Herstellung eines Medikaments zur Hemmung der Expression eines vorgegebenen Gens vorgesehen, wobei ein Strang der dsRNA zumindest abschnittsweise komplementär zu diesem Gen ist. – Die Verwendung eines Vektors ermöglicht eine besonders wirksame Therapie.

Hinsichtlich vorteilhafter Ausgestaltungen des Medikaments und der Verwendung wird auf die Beschreibung der vorangegangenen Merkmale verwiesen.

#### Ausführungsbeispiel

Mittels herkömmlicher Verfahren ist ein aus dem einzigen Sequenzprotokoll erziehlicher RNA-Einzeldstrang enzymatisch synthetisiert worden.

Ferner ist der dazu komplementäre RNA-Einzeldstrang synthetisiert worden. Anschließend sind der Einzeldstrang und der dazu komplementäre Einzeldstrang zur dsRNA vereinigt worden. Die so hergestellte dsRNA enthält eine bestimmte DNA-Sequenz unter der Kontrolle des "immediate early gene"-Promotors des Cytomegalievirus.

#### Versuchsprotokoll

Es wurde ein Plasmid-Vektor konstruiert, unter dessen Verwendung die benötigte dsRNA hergestellt werden

konnte. Für dessen Konstruktion wurden Oligodesoxyribonukleotide als Primer für eine Polymerase-Kettenreaktion (PCR) verwendet, von denen eines die Sequenz einer EcoRI-Schmitstelle und des T7-NA-Polymerase-Promotors (5'-GGATTC ATTA CCA CTC ACT ATA CGG CGA TCA GAT CTC TAG AAC-3'), das andere die einer BamHI-Schmitstelle und des SP6-RNA-Polymerase-Promotors (5'-GGG ATC CAT TTA GGT GAC ACT ATA GAA TAC CCA TGA TCG CGT AGT CGA TA-3') enthielt. Darauf hinaus enthielten diese Primer an ihren 3'-Enden die identischen bzw. komplementären Bereiche zur klinisch erwerbbaren "positive control DNA" des HeLaScribe® Nuclear Extract in vitro Transkriptionskits der Fa. Promega, die auch als Matrize für die PCR diente. Die Länge des so amplifizierten DNA-Fragments betrug 400 Basenpaare, wobei 340 Basenpaare der "positive control DNA" entsprachen. Nach PCR wurde das Produkt mit EcoRI und BamHI geschnitten. Als Klörungselement für das erhaltenen PCR-Produkt diente der Vektor pUC18. Es erfolgte Transfektion von *E. coli* XL1-blue. Plasmid-DNA eines ausgewählten Klons, deren Sequenz durch partielle Sequenzierung überprüft worden war, wurde mit EcoRI bzw. BamHI linearisiert und als Matrize für eine in vitro Transkription mit SP6- bzw. T7-NA-Polymerase verwendet (Riboprobe in vitro Transcription Systems, Fa. Promega).

Zur Hybridisierung wurden 500 µl der in Ethanol aufbewahrten einzelssträngigen RNA durch Zentrifugation gefällt, das getrocknete Pellet in 5 µl PIPES-Puffer (pH 6.4) in Gegenwart von 80% Formamid, 400 mM NaCl und 1 mM EDTA aufgenommen, jeweils 15 µl der komplementären Einzelsstränge zusammengegeben und für 10 min auf 85°C erhitzt. Anschließend wurden die Ansätze bei 50°C über Nacht inkubiert und auf Raumtemperatur abgekühlt. Um reine dsRNA zu erhalten, wurden die einzelssträngigen RNAs durch einzelsstrangspezifische RNases abgeschnitten. Hierzu wurde zu allen Ansätzen 100 µl Tris (pH 7.4), 300 mM NaCl und 5 mM EDTA, 1 µl RNaseA (10 mg/ml) und 2 µl RNaseT1 (290 µg/ml) zugegeben. Die Ansätze wurden 1 h bei 30°C inkubiert. Danach wurden die RNAsen durch Zugabe von 5 µl Proteinase K (20 mg/ml) und 10 µl 20% SDS und Inkubation für 30 min bei 37°C deaktiviert. Die dsRNA wurde durch Phenol-Extraktion gereinigt und mit Ethanol gefällt. Das getrocknete Pellet wurde in 15 µl TE-Puffer, pH 6.5 aufgenommen.

#### Testsystem mit menschlichem Zellkernextrakt

Unter Verwendung des HeLaScribe® Nuclear Extract in vitro Transkriptionskits der Fa. Promega wurde die Transkriptionsspezifität des oben angegebenen DNA-Fragments ("positive control DNA") in Gegenwart der beiden einzelssträngigen Oligoribonukleotide sowie der dsRNA bestimmt. Dies erfolgte anhand der die "run off"-Transkripte inkorporierten Radikalaktivität des als Substrat verwendeten [ $\alpha^{32}P$ ] GTP. Die Trennung des freien GTP vom entstandenen Transkript wurde mittels Gelektrophorese vorgenommen. Die Auswertung des Gels erfolgte mit Hilfe eines Radikalaktivitätsdetektors (Instant-Imager).

#### Ergebnis und Schlussfolgerung

Es zeigte sich eine deutliche Verringerung der Menge an Transkript in Gegenwart von dsRNA im Vergleich zum Kontrollansatz ohne RNA sowie auch zu den Ansätzen mit einzelssträngiger RNA. Die Wirksamkeit der dsRNA war schon bei Zugabe vergleichbar kleinen Mengen (ca. 1 µg) zu erkennen. Der hemmende Effekt einzelssträngiger Antisense-RNA wäre in diesem Testsystem nicht nachzuweisen, da hierbei

die Inhibition auf der Ebene der Translation stattfindet. Hier wurde die Transkription untersucht. Die hiermit erstmals beim Menschen beobachtete Reduzierung der Transkript-Menge eines Gens in Gegenwart von dsRNA zeigt deutlich eine Hemmung der Expression des entsprechenden Gens an. Dieser Effekt ist auf einen neuartigen, durch die dsRNA bedingten Mechanismus zurückzuführen.

#### Literatur

- 10 Asanuma, H., Ito, T., Yoshida, T., Liang, X. & Komiyama, M. (1999). Photoregulation der Bildung und Dissoziation eines DNA-Duplexes durch cis-trans-Isomerisierung einer Azobenzeneinheit. *Angew. Chem.*, 111, 2547-2549.
- 15 Azhayeva, E., Azhayev, A., Auriola, S., Tengvall, U., Unti, A. & Lönnberg, H. (1997). Inhibitory properties of double helix forming circular oligoribonucleotides. *Nucl. Acids Res.* 25, 4954-4961.
- 20 Castelli, J., Wood, K. A. & Youle, R. J. (1998). The 2'-SA system in viral infection and apoptosis. *Biomed. Pharmacother.* 52, 386-390.
- 25 Dolinnaya, N. G., Blumenfeld, M., Merenkova, I., Orekhova, T. S., Krynetskaya, N. F., Ivanovskaya, M. G., Vasilev, M. & Shaburova, Z. A. (1993). Oligoribonucleotide circulation by template-directed chemical ligation. *Nucl. Acids Res.* 21, 5403-5407.
- 30 Expert-Bazançón, A., Milet, M. & Carbon, P. (1983). Precise localization of several covalent RNA-RNA cross-link in Escherichia coli 16S RNA. *Eur. J. Biochem.* 136, 267-274.
- 35 Finn, A., Xu, S., Montgomery, M. K., Kostas, S. A., Driver, S. E. & Mello, C. C. (1998). Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in Cenorhabditis elegans. *Nature* 391, 806-811.
- 40 Guo, H., Yang, M., Patel, R. & Cook, A. F. (1995). Circulation of oligoribonucleotides by disulfide bridge formation. *Nucl. Acids Res.* 23, 2025-2029.
- 45 Gryzlov, S. M. & Letsinger, R. L. (1993). Template controlled coupling and recombination of oligoribonucleotide blocks containing thiophosphoryl groups. *Nucl. Acids Res.* 21, 1403-1408.
- 50 Kaufman, R. J. (1999). Double-stranded RNA-activated protein kinase mediates virus-induced apoptosis: A new role for an old actor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96, 11693-11695.
- 55 Lipson, S. E. & Hearst, J. E. (1988). Psoralen cross-linking of ribosomal RNA. In Methods in Enzymology. Anonymous pp. 330-341.
- 60 Liu, Z. R., Sargueil, B. & Smith, C. W. (1998). Detection of a novel ATP-dependent cross-linked protein at the 5' splice site-U1 small nuclear RNA duplex by methylene blue-mediated photo-cross-linking. *Mol. Cell. Biol.* 18, 6910-6920.
- 65 Micura, R. (1999). Circular oligoribonucleotides (RNA) by solid-phase synthesis. *Chem. Eur. J.* 5, 2077-2082.
- 70 Skripkin, E., Isel, C., Marquet, R., Ehresmann, B. & Ehresmann, C. (1996). Psoralen crosslinking between human immunodeficiency virus type 1 RNA and primer (rRNA)<sub>13</sub>. *Nucl. Acids Res.* 24, 509-514.
- 75 Wang, S. & Kool, E. T. (1994). Circular RNA oligoribonucleotides: Synthesis, nucleic acid binding properties, and a comparison with circular DNAs. *Nucl. Acids Res.* 22, 2236-2233.
- 80 Wang, Z. & Rane, T. M. (1996). RNA conformation in the Tax-TAR complex determined by site-specific photo-cross-linking. *Biochem.* 35, 6491-6499.
- 85 Watkinson, K. F. & Agabian, N. (1991). In vivo UV cross-linking of U snRNAs that participate in trypanosome trans-splicing. *Genes & Development* 5, 1859-1869.

- Wengel, J. (1999). Synthesis of 3'-C- and 4'-C-branched oligodeoxynucleotides and the development of locked nucleic acid (LNA). *Acc. Chem. Res.* 32, 301-310.  
 Zwieb, C., Ross, A., Rinke, J., Meinke, M. & Brimacombe, R. (1978). Evidence for RNA-RNA cross-link formation in *Escherichia coli* ribosomes. *Nucl. Acids Res.* 5, 2705-2720.

## Parentansprüche

1. Verfahren zur Hemmung der Expression eines vor-gegebenen Zielgens in einer Zelle, wobei ein Oligoribonukleotid (dsRNA) mit doppelsträngiger Struktur in die Zelle eingebracht wird, wobei ein Strang der dsRNA zumindest abschnittsweise komplementär zum Zielgen ist, dadurch gekennzeichnet, daß der zum Zielgen komplementäre Bereich höchstens 49 aufeinanderfol-gende Nukleotidpaare aufweist.
2. Verfahren zur Hemmung der Expression eines vor-gegebenen Zielgens in einer Zelle, wobei ein Vektor zur Kodierung von Oligoribonukleotiden (dsRNA) mit doppelsträngiger Struktur zur Hemmung der Expression eines vorgegebenen Zielgens in die Zelle einge-bringt wird, wobei ein Strang der dsRNA zumindest ab-schnittsweise komplementär zum Zielgen ist, dadurch gekennzeichnet, daß der zum Zielgen komplementäre Bereich höchstens 49 aufeinanderfolgendes Nukleotid-paare aufweist.
3. Verfahren nach Anspruch 1 oder 2, wobei die dsRNA in mittelare Strukturen, vorzugsweise in Liposo-men, eingeschlossen wird.
4. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei die dsRNA in virale natürliche Kapside oder in auf chemischen oder enzymatischen Weg her-gestellte künstliche Kapside oder davon abgeleitete Strukturen eingeschlossen wird.
5. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei die dsRNA 10 bis 1000, vorzugsweise 15 bis 49, Basenpaare aufweist.
6. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei das Zielgen in eukaryontischen Zellen ex-primiert wird.
7. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei das Zielgen aus der folgenden Gruppe ausgewählt ist: Onkogen, Cytokin-Gen, Id-Protein-Gen, Entwicklungsprionen.
8. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei das Zielgen in pathogenen Organismen, vorzugsweise in Plasmiden, exprimiert wird.
9. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei das Zielgen Bestandteil eines Virus oder Vi-roids ist.
10. Verfahren nach Anspruch 9, wobei das Virus ein humopathogenes Virus oder Viroid ist.
11. Verfahren nach Anspruch 9, wobei das Virus oder Viroid ein tier- oder pflanzenpathogenes Virus oder Vi-roid ist.
12. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei die dsRNA abschnittsweise doppel-strängig ausgebildet ist.
13. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei der komplementäre Bereich aus zwei separaten RNA-Einzelsträngen oder aus selbstkomple-mentären Bereichen eines, vorzugsweise zirkulär aus-gedrehten, topologisch geschlossenen RNA-Einzel-strangs gebildet wird.
14. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei der komplementäre Bereich aus selb-stkomplementären Bereichen einer RNA-Haarmodel-
15. Verfahren nach einem der vorhergehenden An-sprüche, wobei die Nukleotide im Schleifenbereich zwischen der doppelsträngigen Struktur zum Schutz vor Abbau chemisch modifiziert sind.
16. Verfahren nach einem der vorhergehenden An-sprüche, wobei die Enden der dsRNA modifiziert wer-den, um einem Abbau in der Zelle oder einer Dissozi-ation in die Einzelstränge entgegenzuwirken.
17. Verfahren nach einem der vorhergehenden An-sprüche, wobei der durch die Nukleotidpaare bewirkte Zusammenhalt des komplementären Bereichs durch mindestens eine, vorzugsweise zwei, weitere chemische Verknüpfungen erhöht wird.
18. Verfahren nach einem der vorhergehenden An-sprüche, wobei die chemische Verknüpfung durch eine kovalente oder ionische Bindung, eine Wasserstoff-brückenbindung, hydrophobe Wechselwirkungen, vor-zugsweise van-der-Waals- oder Stäppelinwechselwir-kungen, oder durch Metall-Ionenkoordination gebil-det wird.
19. Verfahren nach einem der vorhergehenden An-sprüche, wobei die chemische Verknüpfung am mindestens einem, vorzugsweise an beiden, Enden des komplementären Bereichs hergestellt wird.
20. Verfahren nach einem der vorhergehenden An-sprüche, wobei die chemische Verknüpfung mittels ei-ner oder mehrerer Verbindungsgruppen gebildet wird, wobei die Verbindungsgruppen vorzugsweise Poly-(oxyphosphinocoxy-1,3-propandi)- und/oder Poly-ethyleneglycol-Ketten sind.
21. Verfahren nach einem der vorhergehenden An-sprüche, wobei die chemische Verknüpfung durch in den komplementären Bereichen anstelle von Purinen benutzte Purinanalogie gebildet wird.
22. Verfahren nach einem der vorhergehenden An-sprüche, wobei die chemische Verknüpfung durch in den komplementären Bereichen eingeführte Azabenzol-einheiten gebildet wird.
23. Verfahren nach einem der vorhergehenden An-sprüche, wobei die chemische Verknüpfung durch in den komplementären Bereichen anstelle von Nukleotid-en benutzte verzweigte Nukleotidanaloga gebil-det wird.
24. Verfahren nach einem der vorhergehenden An-sprüche, wobei zur Herstellung der chemischen Ver-knüpfung mindestens eine der folgenden Gruppen bu-nzt wird: Methylenblau; bifunktionelle Gruppen, vorzugsweise Bis-(2-chloroethyl)-amin; N-acyl-N'-(p-glycol-benzoyl)-cystamine; 4-Thiouracil; Psoralen.
25. Verfahren nach einem der vorhergehenden An-sprüche, wobei die chemische Verknüpfung durch an den Enden des doppelsträngigen Bereichs angebrachte Thiolphosphoryl-Gruppen gebildet wird.
26. Verfahren nach einem der vorhergehenden An-sprüche, wobei die chemische Verknüpfung an den Enden des doppelsträngigen Bereichs durch Tripelhelix-Bindungen hergestellt wird.
27. Verfahren nach einem der vorhergehenden An-sprüche, wobei die dsRNA an mindestens ein von ei-tem Virus stammendes, davon abgeleitetes oder ein synthetisch hergestelltes virales Hillprotein gebunden, damit assoziiert oder davon umgeben wird.
28. Verfahren nach einem der vorhergehenden An-sprüche, wobei das Hillprotein vom Polymaviruss ab-geleitet ist.
29. Verfahren nach einem der vorhergehenden An-sprüche, wobei das Hillprotein das Virus-Protein 1

- (VP1) und/oder das Virus-Protein 2 (VP2) des Poliovirus enthält.
30. Verfahren nach einem der vorgehenden Ansprüche, wobei bei Bildung eines Kapsids oder kapsidartigen Gebildes aus dem Hüllprotein die Seite zum Inneren des Kapsids oder kapsidartigen Gebildes gewandt ist.
31. Verfahren nach einem der vorgehenden Ansprüche, wobei die dsRNA zum primären oder prozesierten RNA-Transkript des Zielgens komplementär ist.
32. Verfahren nach einem der vorgehenden Ansprüche, wobei eine Vertebratenzelle oder eine menschliche Zelle ist.
33. Medikament mit mindestens einem Oligoribonukleotid (dsRNA) mit doppelsträngiger Struktur zur Hemmung der Expression einer vorgegebenen Zielgens, wobei ein Strang der dsRNA zumindest abschnittsweise komplementär zum Zielgen ist.
34. Medikament mit mindestens einem Vektor zur Kodierung von Oligoribonukleotiden (dsRNA) mit doppelsträngiger Struktur zur Hemmung der Expression eines vorgegebenen Zielgens, wobei ein Strang der dsRNA zumindest abschnittsweise komplementär zum Zielgen ist.
35. Medikament nach Anspruch 33 oder 34, wobei die dsRNA verpackt in mikellare Strukturen, vorzugsweise in Liposomen, verlegt.
36. Medikament nach Anspruch 33 oder 35, wobei die dsRNA in viralen natürlichen Kapside oder in auf chemischem oder enzymatischem Weg hergestellte künstliche Kapside oder davon abgeleitete Strukturen eingeschlossen ist.
37. Medikament nach einem der Ansprüche 33 bis 36, wobei dsRNA 10 bis 1000, vorzugsweise 15 bis 49, Basenpaare aufweist.
38. Medikament nach einem der Ansprüche 33 bis 37, wobei das Zielgen in eukaryotischen Zellen exprimierbar ist.
39. Medikament nach einem der Ansprüche 33 bis 38, wobei das Zielgen aus der folgenden Gruppe ausgewählt ist: Onkogen, Cytokin-Gen, Id-Protein-Gen, Entwicklungsgen, Prötogen.
40. Medikament nach einem der Ansprüche 33 bis 39, wobei das Zielgen in pathogenen Organismen, vorzugsweise in Plasmiden, exprimierbar ist.
41. Medikament nach einem der Ansprüche 33 bis 40, wobei das Zielgen Bestandteil eines Virus oder Viroids ist.
42. Medikament nach Anspruch 41, wobei das Virus ein humanpathogenes Virus oder Viroid ist.
43. Medikament nach Anspruch 41, wobei das Virus oder Viroide ein tier- oder pflanzenpathogenes Virus oder Viroid ist.
44. Medikament nach einem der Ansprüche 33 bis 43, wobei die dsRNA abschnittsweise doppelsträngig gebildet ist.
45. Medikament nach einem der Ansprüche 33 bis 44, wobei der komplementäre Bereich höchstens 49 aufeinanderfolgende Nukleotidpaare aufweist.
46. Medikament nach einem der Ansprüche 33 bis 45, wobei der komplementäre Bereich aus zwei separaten RNA-Einzelsträngen oder aus selbstkomplementären Bereichen eines, vorzugsweise zirkulär ausgebildeten, topologisch geschlossenen, RNA-Einzelstrangs gebildet ist.
47. Medikament nach einem der Ansprüche 33 bis 46, wobei der komplementäre Bereich aus zelsubkomple-

mentären Bereichen einer RNA-Haarmadelschleife gebildet ist.

48. Medikament nach einem der Ansprüche 33 bis 47, wobei die Nukleotide im Schleifenbereich zwischen der doppelsträngigen Struktur zum Schutz vor Abbau chemisch modifiziert ist.

49. Medikament nach einem der Ansprüche 33 bis 48, wobei die Enden der dsRNA modifiziert sind, um einen Abbau in der Zelle oder einer Dissoziation in die Einzelstränge entgegenzuwirken.

50. Medikament nach einem der Ansprüche 33 bis 49, wobei der durch die Nukleotidpaare bewirkte Zusammenhalt des komplementären Bereichs durch mindestens eine, vorzugsweise zwei, weitere chemische Verknüpfungen erhöht ist.

51. Medikament nach einem der Ansprüche 33 bis 50, wobei die chemische Verknüpfung durch eine kovalente oder ionische Bindung, eine Wasserstoffbrückenbindung, hydrophobe Wechselwirkungen, vorzugsweise van-der-Waals- oder Stapelungswechselwirkungen, oder durch Metall-Ionenkoordination gebildet ist.

52. Medikament nach einem der Ansprüche 33 bis 51, wobei die chemische Verknüpfung mindestens einer, vorzugsweise an beiden, Enden des komplementären Bereichs hergestellt ist.

53. Medikament nach einem der Ansprüche 33 bis 52, wobei die chemische Verknüpfung mittels einer oder mehrerer Verbindungsgruppen gebildet ist, wobei die Verbindungsgruppen vorzugsweise Poly-(oxyphosphinoxy-1,3-propandiyl)- und/oder Poly(ethyleneglycol)-Ketten sind.

54. Medikament nach einem der Ansprüche 33 bis 53, wobei die chemische Verknüpfung durch in den komplementären Bereichen anstelle von Purinen benutzte Purinanaloga gebildet ist.

55. Medikament nach einem der Ansprüche 33 bis 54, wobei die chemische Verknüpfung durch in den komplementären Bereiche eingeschaltete Azabenzoleinheiten gebildet ist.

56. Medikament nach einem der Ansprüche 33 bis 55, wobei die chemische Verknüpfung durch in den komplementären Bereichen anstelle von Nukleotiden benutzte verzweigte Nukleotidanaloga gebildet ist.

57. Medikament nach einem der Ansprüche 33 bis 56, wobei zur Herstellung der chemischen Verknüpfung mindestens eine der folgenden Gruppen benutzt wird: Methylenblau; bifunktionale Gruppen, vorzugsweise Bis-(2-chlorethyl)-amin; N-acetyl-N-(*p*-glyoxyl-benzoyl)-cystamin; 4-Thioureas; Psoralen.

58. Medikament nach einem der Ansprüche 33 bis 57, wobei die chemische Verknüpfung durch an den Enden des doppelsträngigen Bereichs vorgesehene Triphosphoryl-Gruppen gebildet ist.

59. Medikament nach einem der Ansprüche 33 bis 58, wobei die chemische Verknüpfung an den Enden des doppelsträngigen Bereichs vorgesehene Triphelhx-Bindungen sind.

60. Medikament nach einem der Ansprüche 33 bis 59, wobei die dsRNA an mindestens ein von einem Virus stammendes, davon abgeleitetes oder ein synthetisch hergestelltes virales Hüllprotein gebunden, damit assoziiert oder davon umgeben ist.

61. Medikament nach einem der Ansprüche 33 bis 60, wobei das Hüllprotein vom Polyomavirus abgeleitet ist.

62. Medikament nach einem der Ansprüche 33 bis 61, wobei das Hüllprotein das Virus-Protein 1 (VP1) und/oder das Virus-Protein 2 (VP2) des Polyomavirus ent-

hält.

63. Medikament nach einem der Ansprüche 33 bis 62, wobei die Bildung eines Kapsids oder kapsidartigen Gebildes aus dem Hüllprotein die eine Seite zum Inneren des Kapsids oder kapsidartigen Gebildes gewandt ist.  
 64. Medikament nach einem der Ansprüche 33 bis 63, wobei die dsRNA zum primären oder posttranskribierten RNA-Transkript des Zielgens komplementär ist.  
 65. Medikament nach einem der Ansprüche 33 bis 64, wobei die Zelle eine Vertebratenzelle oder eine menschliche Zelle ist.  
 66. Verwendung eines Oligoribonukleotids (dsRNA) mit doppelsträngiger Struktur zur Herstellung eines Medikaments zur Hemmung der Expression eines vorliegenden Zielgens, wobei ein Strang der dsRNA zumindest abschnittsweise komplementär zum Zielgen ist.  
 67. Verwendung eines Vektors zur Kodierung Oligoribonukleotide (dsRNA) mit doppelsträngiger Struktur zur Herstellung eines Medikaments zur Hemmung der Expression eines vorgegebenen Zielgens, wobei ein Strang der dsRNA zumindest abschnittsweise komplementär zu diesem Gen ist.  
 68. Verwendung nach Anspruch 66 oder 67, wobei die dsRNA verpackt in mikellare Strukturen, vorzugsweise in Liposomen, vorliegt.  
 69. Verwendung nach Anspruch 66 oder 68, wobei die dsRNA in virale natürliche Kapside oder in auf chemischem oder enzymatischem Wege hergestellte künstliche Kapside oder davon abgeleitete Strukturen eingeschlossen ist.  
 70. Verwendung nach einem der Ansprüche 66 bis 69, wobei dsRNA 10 bis 1000, vorzugsweise 15 bis 49, Basenpaare aufweist.  
 71. Verwendung nach einem der Ansprüche 65 bis 70, wobei das Zielgen in eukaryontischen Zellen exprimierbar ist.  
 72. Verwendung nach einem der Ansprüche 66 bis 71, wobei das Zielgen aus der folgenden Gruppe ausgewählt ist: Onkogen, Cytokin-Gen, Id-Protein-Gen, Entwicklungsagen, Prötogenen.  
 73. Verwendung nach einem der Ansprüche 65 bis 72, wobei das Zielgen in pathogenen Organismen, vorzugsweise in Plasmodien, exprimierbar ist.  
 74. Verwendung nach einem der Ansprüche 66 bis 73, wobei das Zielgen Bestandteil eines Virus oder Viroids ist.  
 75. Verwendung nach Anspruch 74, wobei das Virus ein humanpathogenes Virus oder Viroid ist.  
 76. Verwendung nach Anspruch 74, wobei das Virus oder Viroid ein tier- oder pflanzlichenpathogenes Virus oder Viroid ist.  
 77. Verwendung nach einem der Ansprüche 66 bis 76, wobei die dsRNA abschnittsweise doppelsträngig ausgebildet ist.  
 78. Verwendung nach einem der Ansprüche 65 bis 77, wobei der komplementäre Bereich aus zwei separaten RNA-Einzelsträngen oder aus selbstkomplementären Bereichen eines, vorzugsweise zirkulär ausgebildeten, topologisch geschlossenen RNA-Einzelstrangs gebildet ist.  
 79. Verwendung nach einem der Ansprüche 66 bis 78, wobei der komplementäre Bereich aus selbstkomplementären Bereichen einer RNA-Haarsäule gleich gebildet wird.  
 80. Verwendung nach einem der Ansprüche 66 bis 79, wobei die Nukleotide im Schleifenbereich zwischen

der doppelsträngigen Struktur zum Schutz vor Abbau chemisch modifiziert sind.

81. Verwendung nach einem der Ansprüche 66 bis 80, wobei die Enden der dsRNA modifiziert sind, um einen Abbau in der Zelle oder einer Dissoziation in die Einzelstränge entgegenzuwirken.  
 82. Verwendung nach einem der Ansprüche 66 bis 81, wobei die durch die Nukleotidpaare bewirkte Zusammenfaltung des komplementären Bereichs durch mindestens eine, vorzugsweise zwei, weitere chemische Verknüpfungen erhöht ist.  
 83. Verwendung nach einem der Ansprüche 66 bis 82, wobei die chemische Verknüpfung durch eine kovalente oder ionische Bindung, eine Wasserstoffbrückenbindung, hydrophobe Wechselwirkungen, vorzugsweise van-der-Waals- oder Stapelungswirkungen, oder durch Metall-Ionenkoordination gebildet ist.  
 84. Verwendung nach einem der Ansprüche 66 bis 83, wobei die chemische Verknüpfung um mindestens cincin, vorzugsweise an beiden, Enden des komplementären Bereichs hergestellt ist.  
 85. Verwendung nach einem der Ansprüche 66 bis 84, wobei die chemische Verknüpfung mittels einer oder mehrerer Verbindungsgruppen gebildet ist, wobei die Verbindungsgruppen vorzugsweise Poly-(oxyphosphinoxy-1,3-propandiol)- und/oder Poly(ethyleneglycol)-Ketten sind.  
 86. Verwendung nach einem der Ansprüche 66 bis 85, wobei die chemische Verknüpfung durch in den komplementären Bereichen anstelle von Purinen benutzte Purinologe gebildet ist.  
 87. Verwendung nach einem der Ansprüche 66 bis 86, wobei die chemische Verknüpfung durch in den komplementären Bereichen eingeführte Azabenzoatseitenketten gebildet ist.  
 88. Verwendung nach einem der Ansprüche 66 bis 87, wobei die chemische Verknüpfung durch in den komplementären Bereichen anstelle von Nukleotiden benutzte verzweigte Nukleotidanaloga gebildet ist.  
 89. Verwendung nach einem der Ansprüche 66 bis 88, wobei zur Herstellung der chemischen Verknüpfung mindestens eins der folgenden Gruppen benutzt wird: Methylenblau; bifunktionelle Gruppen, vorzugsweise Bis-(2-chlorethyl)-amin; N-acetyl-N'-(p-glyoxybenzoyl)-cystein; 4-Thiouracil; Psoralen.  
 90. Verwendung nach einem der Ansprüche 66 bis 89, wobei die chemische Verknüpfung durch an den Enden des doppelsträngigen Bereichs angebrachte Thiophosphoryl-Gruppen gebildet ist.  
 91. Verwendung nach einem der Ansprüche 66 bis 90, wobei die chemische Verknüpfung an den Enden des doppelsträngigen Bereichs durch Tripelhelix-Bindungen hergestellt ist.  
 92. Verwendung nach einem der Ansprüche 66 bis 91, wobei die dsRNA an mindestens ein von einem Virus stammendes, davon abgeleitetes oder ein synthetisch hergestelltes virales Hüllprotein gebunden, damit assoziiert oder davon umgeben ist.  
 93. Verwendung nach einem der Ansprüche 66 bis 92, wobei das Hüllprotein vom Polyomavirus abgeleitet ist.  
 94. Verwendung nach einem der Ansprüche 66 bis 93, wobei das Hüllprotein das Virus-Protein 1 (VP1) und/oder das Virus-Protein 2 (VP2) des Polyomavirus enthält.  
 95. Verwendung nach einem der Ansprüche 66 bis 94, wobei bei Bildung eines Kapsids oder kapsidartigen Gebildes aus dem Hüllprotein die eine Seite zum Inter-

ren des Kapsids oder kapsidartigen Gebildes gewandt ist.

96. Verwendung nach einem der Ansprüche 66 bis 95, wobei die dsRNA zum primitiven oder prozessierten RNA-Transkript des Zielgens komplementär ist.

97. Verwendung nach einem der Ansprüche 66 bis 96, wobei die Zelle eine Vertebratenzelle oder eine menschliche Zelle ist.

98. Verwendung nach einem der Ansprüche 66 bis 97, wobei das Medikament in die Blutbahn oder das Interstitium des zu therapiierenden Organismus injizierbar ist.

99. Verwendung nach einem der Ansprüche 66 bis 98, wobei die dsRNA bzw. der sie kodierende Vektor in Bakterien oder Mikroorganismen aufgenommen sind.

100. Verwendung nach einem der Ansprüche 66 bis 99, wobei der komplementäre Bereich höchstens 49 aufeinanderfolgende Nukleotidpaare aufweist.

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

Cover sheet

Federal Republic of Germany

Certificate

Dr. Roland Kreutzer in Weidenberg, Germany and Dr. Stefan Limmer in Bayreuth, Germany handed in a patent application with the title:

"Treatment and medicine for the inhibition of the expression of a given gene"

on November 24 1999 to the German Patent and Trademark office and declared that they have taken into consideration the inner priority of the application in the Federal Republic of Germany from January 30 1999, file 199 03 713.2.

The attached piece is a correct and precise rendition of the previous document of this patent application.

The application has provisionally received the designation C 12 N and A 61 K of the international patent classification.

Munich, the May 11 2000  
German Patent and Trademark office  
The President  
By order of

(signature)

(printed name partially missing)

File: 199 56 568.6

Treatment and medicine for the inhibition of the expression of a given gene.

The invention concerns a treatment according to the genus of claim 1. It concerns, moreover, a medication and the usage of a double stranded oligoribonucleotide.

Such a treatment is known from the published WO 99/32619. The familiar treatment targets the inhibition of the expression of genes in cells of invertebrates. For this it is necessary that the double stranded oligoribonucleotide shows an identical sequence with a length of at least 50 bases, to that of the target gene. To attain an efficient inhibition a length of the identical sequence of 300 to 1000 base pairs are necessary. The cost of producing such an oligoribonucleotide is very high.

The DE 196 21 919 C2 describes an anti-sense-RNA with special secondary structures, whereby the anti-sense-RNA is present in the form of a coding vector. With the anti-sense-RNA one is dealing with a RNA molecule that is complementary to areas of the mRNA. By connecting to these areas the inhibition of the gene expression is brought into effect. This inhibition can, in particular, be used for diagnosis and/or therapy of sicknesses, e.g. tumor sicknesses or viral infections. The anti-sense-RNA unfortunately must be delivered to the cells in large quantities, which are at least as large as the amount of mRNA. The effectiveness of the familiar anti-sense-treatment is not particularly high.

A medication is known from US 5,712,257 that contains incorrectly paired double stranded RNA (dsRNA) and biologically active incorrectly paired pieces of dsRNA in the form of a ternary complex with a surface active agent. The dsRNA used consists of a synthetically produced nucleic acid single strands without a defined vase sequence. The single strands are not in regular so-called "Not-Watson-Crick" base pairings with each other so that incorrectly paired double strands are formed. The known dsRNA is used for the inhibition of the propagation of retroviruses, such as HIV. The propagation of the virus can be inhibited if dsRNA that is not sequence specific is delivered to the cells. This leads to an induction of interferon, through which the virus propagation is supposed to be inhibited. The inhibiting effect as well as the effectiveness of this treatment is small.

From Fire, A. et al, NATURE, Vol. 391, pp. 806 it is known that dsRNA, of which one strand has sections complementary to a gene of a filament worm that is to be inhibited, is highly effective in inhibiting that gene. The view is that, the special effectiveness of the dsRNA used in cells of the filament worm is not based on the anti-sense-principles, but instead are possibly the result of the catalytic properties of the dsRNA, or the induced enzymes. Nothing is mentioned of the effectiveness of specific dsRNA relating to the inhibition of gene expression, especially in mammal and human cells, in this article.

The task of this invention is to eliminate the disadvantages according to the status of technology. It should especially specify a treatment and medication as efficient as possible, as well as a procedure as efficient as possible to produce a medication, with which a especially effective inhibition of the expression of a given gene is possible.

Page 3

This problem is solved by the characteristics of the claims 1, 2, 33, 34 and 66 and 67. Advantageous designs arise from claims 3 to 32, 35 to 65 and 68 to 100.

According to the requirement of the procedural side of the invention the area complementary to the target gene can have at the most 49 consecutive nucleotide pairs.

The oligoribonucleotides the invention is dealing with are such that they at least show a defined nucleotide sequence in sections. The defined section can be limited to the complementary region. However, it is also possible that the double stranded oligoribonucleotide show a defined nucleotide sequence as a whole.

It has surprisingly been shown, that already with a length of the complementary area of at most 49 base pairs can achieve inhibition of the expression of the target gene. Appropriate oligoribonucleotides can be supplied with a low manufacturing cost.

In particular dsRNA with a length of more than 50 nucleotide pairs induce specific cellular mechanisms in the human and mammal cells, e.g. the dsRNA dependent protein kinase or the 2-5A-system. That leads to the elimination of the interference effect caused by dsRNA with one defined sequence. This causes the protein biosynthesis in the cell to be blocked. This disadvantage is eliminated by this particular invention.

Furthermore, the uptake of dsRNA with a short chain length into the cell or the cell nucleus is easier as opposed to the long chained dsRNAs.

If the dsRNA is used as an active ingredient it has proven to be advantageous to pack the dsRNA in micellar structures, preferably in liposomes. The dsRNA can also be enclosed in natural viral capsids, capsids produced in an enzymatic way, capsids produced chemically or structures derived from them. The aforementioned characteristics make it possible for the dsDNA to infiltrate the given target cells.

According to another arrangement characteristic the dsRNA has 10 to 1000 preferably 15 to 49 base pairs. The dsRNA can therefore be longer than the complementary region of the target gene. The complementary region can be arranged terminally or can be activated in the dsRNA. Such a dsRNA or a similarly coded vector can be manufactured synthetically or through popular enzymatic techniques.

The gene to be inhibited is expediently expressed into eukaryotic cells. The target gene can be chosen from the following group: oncogene, cytokine gene, id-protein-gene, development gene, prion gene. It can also be expressed into pathogen organisms, preferably plasmodium. It can be part of, preferably human pathogens, virus or viroids. The proposed medicine allows the therapy of genetically controlled diseases, such as cancer, viral sicknesses or morbus Alzheimer.

The virus or viroid can also be an animal or plant pathogen virus or viroid. In this case the drug pertaining to the invention allows the treatment of animal and plant sicknesses as well.

According to another design characteristic the dsRNA takes on a double stranded form in some sections. The complementary section is formed from two separate RNA single strands or from a self complementary sections of a, preferably circularly shaped topologically closed RNA single strand.

The ends of the dsRNA can be modified in order to counteract degradation in the cell or dissociation in the single strands. Dissociation occurs especially when using low concentrations or short chain lengths. For particularly effective inhibition of the dissociation the cohesion resulting from the nucleotide pairs in the complementary region can be increased through at least one, preferably two, further chemical catenations. The dsRNA pertaining to the invention, whose dissociation is lessened, shows a higher stability against enzymatic and chemical degradation in the cell as well as the organism.

In particular, with the use of the vector pertaining to the invention the complementary section can be formed of self complementary regions or a RNA hairpin loop. The nucleotides are chemically modified in the loop region between the double stranded structure in order to protect from degradation.

The chemical catenation is expediently formed of a covalent or ionic bond, a hydrogen bridge bond, hydrophobic interactions, preferably van der Waals or stapling interactions, or through metal ion coordination. It can also be formed according to a very advantageous arrangement characteristic on one preferably on both ends of the complementary area.

It has also proved to be advantageous for the chemical catenation to be formed by means of one or more bonding groups, where the bonding groups are preferably poly-(oxyporphinicooxy-1,3-propanediol) and/or polyethyleneglycol-chains. The chemical catenation can also be formed by purinanalogues used by purins in the complementary area. It is further of advantage, that the chemical catenation in the complementary section is formed by the azabenzo units released into the complementary area. Furthermore, it can be formed by the branched nucleotide analogues present instead of nucleotides.

It has also been shown to be expedient, that for the creation of the chemical catenation at least one of the following groups be used: methyl blue, bi-functional groups, preferably bis-(2-chloroethyl)-amine; N-acetyl-N'-(p-glyoxyl-benzoyl)-cystamine; 4-thiouracil; psoralen. Further, the chemical catenation can be formed by thiophosphoryl groups placed on the ends of the double stranded section. The chemical catenation is preferably created by triple helix bonds on the end of the double strand section.

The chemical catenation can expediently be induced by ultraviolet light.

According to another especially advantageous form it is designed so that the dsRNA is bound associated or surrounded by at least one viral envelope protein taken from a virus or synthetically manufactured.

The envelope protein can be derived from the polyomavirus. It can contain the envelope protein of the virus protein 1 (VP1) and/or the virus protein 2 (VP2) of the polyomavirus. The aforementioned characteristics make it considerably easier to introduce the dsRNA into the cell.

Preferably one side is turned towards the inside of the capsids or capsid-like structure during the formation of a capsid or capsid-like structure out of the envelope protein. The construct formed is especially stable.

The dsRNA can be complementary to the primary or to the processed RNA-transcript of the target gene. The cell can be a cell of a vertebrate or a human cell.

Furthermore, according to the requirements of the invention a drug with at least one oligoribonucleotide with a double strand structure is needed for the inhibition of the expression of a given gene, where one strand is at least partially complementary to this gene. It has surprisingly been shown that such dsRNA is suitable as a drug for the inhibition of the expression of a given gene in human cells. The inhibition already takes effect when concentrations of it are used that are at least one order of magnitude smaller than those used when using single stranded oligoribonucleotides. The drug associated with the invention is highly effective. Few side effects are anticipated.

According to further requirement of the invention a drug with at least one vector for the coding of double stranded oligoribonucleotides (dsRNA) for the inhibition of the expression of a given gene is provided for, where one strand of the dsRNA is at least partially complementary to this gene. The proposed drug shows boasts the aforementioned advantages. Through the usage of a vector manufacturing costs can be saved.

One especially advantageous design is that the complementary area has a maximum of 49 consecutive nucleotide pairs. It has surprisingly been shown that already with a length of the complementary section of a maximum of 49 base pairs a efficient inhibition of the expression of the target gene can be achieve. Corresponding oligoribonucleotides can be made available at a low production cost. (Note: This paragraph has a line by its side, perhaps to draw attention to it).

According to further requirements of the invention the use of double stranded oligoribonucleotides is necessary for the production of a drug for the inhibition of the expression of a given gene, where one strand of the dsRNA is at least partially complementary to this gene. Surprisingly such a dsRNA is suitable for the production of a drug for the inhibition of the expression of a given gene. When using dsRNA the inhibition takes place with a concentration that is at least one order of magnitude smaller than the concentration needed of a single stranded oligoribonucleotide. The procedure

associated with the invention therefore makes the production of especially effective drugs possible.

According to further requirement of the invention, the use of a vector to code double-stranded oligoribonucleotides (dsRNA) for the production of a medicine for the inhibition of the expression a given gene is prescribed, where a strand of the dsRNA is at least partially complementary to the gene. The use of a vector makes a very effective gene therapy possible.

When considering the advantageous designs of the medicine and its use reference will made to the preceding characteristics.

### Embodiment

By means of conventional methods one of the only sequence protocol apparent RNA single strands was enzymatically synthesized.

In addition the RNA single strand complementary to it was synthesized. Subsequently the single strand and the single strand complementary to it was combined into dsRNA. The dsRNA produced contains a particular DNA sequence under the control of the "immediate early gene" promoter of the cytomegalievirus.

### Experimental Protocol

A plasmid vector was constructed, with which the necessary dsRNA could be produced. For its construction oligodesoxyribonucleotides were used as primers for a polymerase chain reaction (PCR), of which one sequence contained a EcoRI interchange and the T7-RNA-polymerase-promoter (5'- GGA ATT CTA ATA CGA CTC ACT ATA GGG CGA TCA GAT CTC TAG AAG - 3'), and the other contained a BamHI-interchange and the SP6-RNA-Polymerase-promoter (5' - GGG ATC CAT TTA GGT GAC ACT ATA GAA TAC CCA TGA TCG CGT AGT CGA TA-3'). Furthermore this primers contain identical or complementary areas on their 3'-ends for the "positive control DNA" of the HeLaScribe Nuclear Extract *in vitro* transcription kit of the firm Promega, that can be acquired by purchase, that also serves as a template for the PCR. The length of the DNA fragment amplified in this way was 400 base pairs, where 340 base pairs qualified as "positive control DNA". After PCR the product was cut with EcoRI and BamHI. The vector pUC18 served as a cloning vector for the PCR product obtained. A transformation of *E. coli* XL1-blue took place. Plasmid DNA of a chosen clone, whose sequence was reviewed using partial sequencing, was linearized using EcoRI and BamHI and was used as a stencil for a *in vitro* transcription with SP6- and T7-RNA-polymerase (riboprobe *in vitro* Transcription Systems, Firm Promega).

For hybridizing the following occurred: 500 µL of single strands RNA kept in ethanol and was precipitated through centrifugation, the dried pellet was taken up in 30 µL PIPES-buffer (ph 6.4) in the presence of 80% Formamid, 400 mM NaCl and 1mM EDTA, 15 µL of the complementary single strands was put together and heated for 10 minutes at 85 degrees Celsius. Next the rudiments were incubated at 50 degrees Celsius overnight and

was then cooled to room temperature. To maintain pure dsRNA, the single strand RNAs were broken down by single strand specific RNase. For this 300 $\mu$ L Tris, pH 7.4, 300mM NaCl and 5mM EDTA 1,2  $\mu$ L RNaseA (10 mg/ml) and 2  $\mu$ L RNaseT1 (290  $\mu$ L/ml) was added to all rudiments. The rudiments were incubated for 1.5 hours at 30 degrees Celsius. Afterwards the RNases were denatured by adding 5  $\mu$ L Proteinase K (20 mg/ml) and 10  $\mu$ L 20% SDS and incubated for 30 min at 37 degrees Celsius. The dsRNA was purified using phenol extraction and precipitated with ethanol. The dried pellet was taken up in 15  $\mu$ L TE-buffer, pH 6.5.

#### Test System with human cell nucleus extract

While using the HeLaScribe Nuclear Extract in vitro transcription kit of the firm Promega the transcription efficiency of the DNA fragment mentioned above ("positive control DNA") was determined in the presence of both single stranded oligoribonucleotides as well as the dsRNA. This took place by means of the radioactivity of the GTP used as a substrate incorporated into the "run off" transcripts. The separation of the free GTP of the transcript created was made by gel electrophoresis. The analysis of the gel occurred with the help of a radioactivity detector (instant imager).

#### Result and Conclusion

A clear decrease in the amount on the transcript in the presence on dsRNA was seen in comparison to the control rudiment with RNA as well as to the rudiments with single stranded RNA. The effectiveness of the dsRNA could be reached even with the addition of small amounts (approximately 1  $\mu$ L) The inhibiting effect of single stranded anti sense RNA could not be proven in this system as the inhibition takes place on the level of the translation. The transcription was examined here. The hereby first time reduction in a human cell of the transcript amount of a gene in the presence of dsRNA clearly shows an inhibition of the expression of the corresponding gene. This effect can be lead back to a new mechanism contingent on dsRNA.